

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknobia-Industri, Laboratorium Teknobia-Pangan Fakultas Teknobiologi, Kampus II Gedung Thomas Aquinas, Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Sementara pengujian total tanin ekstrak etanol daun ungu dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari 2016 sampai Juni 2016. Jadwal penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik Mettler Toledo AI204, oven Venticell, *laminair air flow* ESCO, *rotary evaporator* RV06-ML KIKA WERKE, *shaker incubator* JSSI300C, autoklaf Hirayama hiclave HVE50, *vortex* 37600 Mixer Termolyne, Microwave Panasonic, inkubator Memmert, ayakan 61 mesh, mesin pembuat serbuk (*meal machine*), erlenmeyer, gelas pengaduk, gelas ukur, gelas beker, corong gelas, *petridish*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung Durham, penjepit kayu, pipet ukur, *pro pipet*, micropipette, tip, *hair dryer*, gelas benda, gelas penutup, pinset, jarum ose, jarum enten, kertas payung, kertas saring, plastik *wrap*, karet gelang, kertas label, *aluminium foil*, *tissue*, kapas, korek api, *sprayer*, lampu spiritus, kompor.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun ungu segar sebanyak 4 kg yang diperoleh dari petani di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta. Selain itu, bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini juga yaitu, etanol 96%, akuades steril, isolat *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, ampicillin disk 10 mg, ampicillin tablet 500 mg, alkohol 70%, medium *Nutrient Agar Oxoid*, medium *Nutrient Broth Oxoid*, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D, medium glukosa cair, medium sukrosa cair, medium laktosa cair, *phenol red*, H₂O₂ 3%, larutan asam sulfanilat dan α *Naphtylene Diamine*, eter, FeCl₃ 1%, kloroform, reagen Meyer, reagen Wagner, reagen Dragendorf, H₂SO₄ 2N, Serbuk Mg, amil alkohol, H₂SO₄ pekat, asetat anhidrat, DMSO dan asam asetat glasial.

C. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan satu faktor yaitu variasi perlakuan berupa variasi pelarut. Jenis pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% dan akuades. Ekstrak yang diperoleh kemudian diujikan pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan 5 kali ulangan. Pengaruh ekstrak yang dihasilkan terhadap kedua jenis bakteri uji kemudian dibandingkan untuk melihat efektivitas ekstrak terhadap kedua jenis bakteri tersebut. Rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh variasi pelarut daun ungu dengan uji zona hambat bakteri uji

Perlakuan	Ulangan	Bakteri	
		<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Ekstrak Daun Ungu dengan pelarut Etanol 96%	1	EE1SA	EE1PA
	2	EE2SA	EE2PA
	3	EE3SA	EE3PA
	4	EE4SA	EE4PA
	5	EE5SA	EE5PA
Ekstrak Daun Ungu dengan pelarut Akuades	1	EA1SA	EA1PA
	2	EA2SA	EA2PA
	3	EA3SA	EA3PA
	4	EA4SA	EA4PA
	5	EA5SA	EA5PA
Kontrol Negatif (etanol 96%)	1	AE1SA	AE1PA
	2	AE2SA	AE2PA
	3	AE3SA	AE3PA
	4	AE4SA	AE4PA
	5	AE5SA	AE5PA
Kontrol Negatif (DMSO)	1	DM1SA	DM1PA
	2	DM2SA	DM2PA
	3	DM3SA	DM3PA
	4	DM4SA	DM4PA
	5	DM5SA	DM5PA
Kontrol negatif (Akuades)	1	AQ1SA	AQ1PA
	2	AQ1SA	AQ1PA
	3	AQ1SA	AQ1PA
	4	AQ1SA	AQ1PA
	5	AQ1SA	AQ1PA
Kontrol Positif (<i>Ampicillin</i>)	1	AM1SA	AM1PA
	2	AM2SA	AM2PA
	3	AM3SA	AM3PA
	4	AM4SA	AM4PA
	5	AM5SA	AM5PA

Keterangan:

EE = ekstrak daun ungu dengan pelarut etanol 96%
 EA = ekstrak daun ungu dengan pelarut akuades
 AM = kontrol positif (ampisilin)
 AE = kontrol negatif (etanol 96%)
 DM = kontrol negatif (DMSO)
 AQ = kontrol negatif (akuades)
 PA = *Pseudomonas aureuginosa*
 SA = *Staphylococcus aureus*

D. Tahapan Pelaksanaan

1. Pengeringan dan penghancuran daun ungu (Winata, 2011 dengan modifikasi)

Daun ungu segar disortasi berdasarkan ukuran (14-16 cm x 8-9 cm), kemudian daun dicuci dengan air mengalir. Daun ungu yang digunakan adalah daun yang berumur empat bulan. Daun ungu yang sudah dicuci, dikeringanginkan dan dijemur. Pengeringan dilakukan dengan dua cara yaitu, penjemuran di bawah sinar matahari dan pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C. Penjemuran di bawah sinar matahari dilakukan selama 2 hari dan dilanjutkan pengeringan menggunakan oven selama 3 hari.

Proses pengeringan tersebut dilakukan mengingat sampel yang digunakan cukup banyak, cuaca tidak menentu, dan untuk mempercepat pengeringan guna mencegah terjadinya pembusukan daun. Daun yang sudah kering kemudian dibuat serbuk menggunakan mesin pembuat serbuk (*mealer machine*) dan dilakukan pengayakan dengan ayakan 61 mesh. Proses pembuatan serbuk kering ini bertujuan untuk mempermudah penetrasi pelarut yang digunakan untuk proses ekstraksi.

2. Ekstraksi daun ungu (Winata, 2011 dengan modifikasi)

Terdapat dua jenis pelarut yang digunakan, yaitu etanol 96% dan akuades. Serbuk daun ungu sebanyak 50 gram dimaserasi dengan cara simplisia direndam dalam pelarut sebanyak 500 ml (perbandingan 1:10) selama ± 24 jam pada suhu ruang (27°C) menggunakan *incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Sampel disaring dengan kertas saring. Residu

yang diperoleh dari hasil penyaringan dimaserasi kembali dengan cara yang sama sebanyak 2 kali. Maserat yang diperoleh, ditampung menjadi satu dan diuapkan untuk memisahkan pelarutnya. Penguapan dilakukan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 78°C untuk pelarut etanol, sementara penguapan untuk pelarut akuades dilakukan dengan menggunakan *waterbath* dengan suhu 80°C.

Berat ekstrak dan rendemen daun ungu yang diperoleh dihitung dengan rumus:

Berat ekstrak (gram) = (berat cawan + berat ekstrak) – berat cawan kosong

Rendemen ekstrak = $\frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$

3. Sterilisasi alat dan medium (Zimbro dkk., 2009)

Alat-alat dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas payung. Medium yang masih cair dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan kertas payung. Alat dan bahan yang disterilisasi dimasukkan ke dalam autoklaf dan dipanaskan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm (atmosfer) selama 15 menit untuk bahan dan 20 menit untuk alat.

4. Pembuatan medium untuk pertumbuhan bakteri uji (Nurainy dkk., 2008 dengan modifikasi).

Pembuatan medium diawali dengan penimbangan medium bubuk dan penambahan akuades seperti petunjuk pada kemasan. Medium yang digunakan pada penelitian ini adalah *nutrient agar* (NA) dan *nutrient broth* (NB). Medium kemudian dipanaskan dalam *microwave* hingga larutan medium homogen yang ditandai oleh warna larutan yang jernih. Medium

kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

5. Uji kemurnian bakteri uji

a. Pengamatan morfologi koloni (Capuccino dan Sherman, 2011)

Biakan mikrobial diambil sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan pada medium NA dengan metode *streak plate*, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, setelah 24 jam dilakukan pengamatan terhadap morfologi koloni meliputi bentuk, tepian, dan kenaikan (*elevation*) koloni, kemudian hasil didokumentasi.

b. Pengecatan Gram (Capuccino dan Sherman, 2011)

Gelas benda dibersihkan secara aseptis menggunakan alkohol. Akuades ditetaskan sebanyak 1 tetes di atas gelas benda. Satu ose biakan bakteri uji diambil dan dicampur dengan tetesan akuades yang ada di gelas benda, kemudian difiksasi dengan menggunakan pengeringan udara atau pemanasan dengan api. Biakan yang telah difiksasi ditetesi secara hati-hati dengan larutan *crystal violet* (Gram A) dan dibiarkan selama satu menit, setelah itu gelas benda dibersihkan menggunakan akuades, kemudian ditetesi larutan *Iodin mordant* (Gram B) dan dibiarkan selama satu menit, lalu dibersihkan dengan akuades. Alkohol 95% (Gram C) dialiri tetes demi tetes untuk menghilangkan pewarnaan (*decolorize*), kemudian dibersihkan dengan akuades dan dikeringkan. Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x45, kemudian didokumentasi.

c. Uji motilitas (Capuccino dan Sherman, 2011)

Biakan bakteri uji diambil menggunakan jarum steril dan diinokulasikan dengan cara ditusukan pada medium agar padat pada tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 24 jam dengan melihat pola pertumbuhan dan penyebaran mikrobia pada agar padat, kemudian didokumentasi.

d. Uji katalase (Capuccino dan Sherman, 2011)

Gelas benda dibersihkan secara aseptis menggunakan alkohol. Satu ose biakan bakteri uji diambil dari koloni biakan dan dipindahkan pada gelas benda yang sudah dibersihkan. Hidrogen peroksida (H_2O_2) ditetaskan, kemudian diamati adanya gelembung udara atau tidak. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung udara, kemudian didokumentasi.

e. Uji sifat biokimia (Harley dan Prescott, 2002 dengan modifikasi)

Pengujian fermentasi karbohidrat dilakukan dengan menggunakan medium glukosa, sukrosa, dan laktosa. Setiap biakan bakteri uji diambil sebanyak 1 ose lalu diinokulasikan pada medium glukosa, sukrosa, dan laktosa yang telah diberi *phenol red* dan tabung Durham. Medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Perubahan warna dan eksistensi gelembung pada tabung Durham diamati dan didokumentasi.

Pengujian reduksi nitrat dilakukan dengan menggunakan medium nitrat. Setiap biakan bakteri uji diambil 1 ose lalu diinokulasikan pada medium nitrat. Medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Pasca inkubasi, asam sulfanilat dan *α Naphthylene Diamine* masing-masing diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi, lalu digojog, diamati, dan didokumentasi. Hasil positif reduksi nitrat ditunjukkan dengan adanya warna merah atau merah muda keunguan.

6. Perbanyakkan bakteri uji (Cappucino dan Sherman, 2011)

Kultur mikrobia diinokulasikan ke dalam medium NA miring, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat bakteri hasil perbanyakkan diambil 1-2 ose, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 20 ml medium cair. Erlenmeyer tersebut kemudian diinkubasi menggunakan *shaker inkubator* pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri tersebut digunakan sebagai bakteri uji pada pengujian aktivitas antibakteri dan penentuan Konsentrasi Hambat Minimum ekstrak daun ungu.

7. Identifikasi fitokimia daun ungu secara kualitatif

a. Uji alkaloid (Harborne, 1987 dengan modifikasi)

Ekstrak daun ungu sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 ml kloroform dan 3 tetes amonia, lalu dikocok. Lapisan kloroform diambil kemudian dilarutkan dalam 1 ml asam sulfat (H_2SO_4) 2N, kemudian dikocok. Setelah itu, fraksi asam (lapisan atas) dibagi ke dalam tiga tabung reaksi yang berbeda. Reagen Dragendorf ditambahkan pada tabung reaksi pertama, Reagen Meyer pada tabung reaksi kedua, dan Reagen Wagner pada tabung reaksi ketiga. Reaksi positif uji alkaloid ditandai dengan terbentuknya

endapan merah pasca penambahan reagen Dragendorff, endapan putih pasca penambahan reagen Meyer, dan endapan coklat pasca penambahan reagen Wagner.

b. Uji flavonoid (Putranti, 2013)

Ekstrak daun ungu diambil sebanyak 0,1 gram dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Serbuk magnesium 0,1 gram dan amil alkohol 0,4 ml ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Etanol teknis sebanyak 4 ml ditambahkan pula dan dicampur hingga homogen. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga.

c. Uji tanin (Ayoola dkk., 2008 dengan modifikasi)

Ekstrak daun ungu sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan akuades sebanyak 2 ml. Ferri klorida (FeCl_3) 1% ditambahkan 1-2 tetes. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan pada sampel.

d. Uji triterpenoid atau steroid (Harborne, 1987 dengan modifikasi)

Ekstrak daun ungu sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml kloroform. Setelah itu, ditambahkan dengan 1 tetes pereaksi Liebermann-Burchard (asetat anhidrat 3 tetes dan H_2SO_4 pekat 1 tetes). Terbentuknya warna merah menandakan adanya senyawa triterpenoid dan terbentuknya warna hijau menandakan adanya senyawa steroid.

e. Uji saponin (Ndam dkk., 2014 dengan modifikasi)

Ekstrak daun ungu sebanyak 0,1 gram ditambah 5 ml akuades kemudian dikocok selama 30 sampai 60 detik. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya busa yang konstan ± 1 cm.

8. Penetapan Kadar Total Tanin ekstrak daun ungu dengan Spektrofotometer UV-Vis (Sapdani, 2016; Chanwitheesuk dkk., 2004 dengan modifikasi).

a. Preparasi ekstrak daun ungu

Ekstrak daun ungu sebanyak 80 mg ditambahkan 10 ml dietil eter dan didiamkan selama 20 jam, kemudian disaring dengan kertas saring. Residu yang diperoleh kemudian diuapkan untuk menghilangkan sisa dietil eter. Setelah itu, ekstrak ditambahkan akuades steril sebanyak 25 ml. Larutan diambil sebanyak 1 ml dan ditambah reagen Folin-ciocalteu sebanyak 0,1 ml, kemudian divorteks.

Larutan ditambah Na_2CO_3 20% sebanyak 2 ml dan didiamkan selama 5 menit. Larutan kemudian ditambah akuades steril hingga volumenya 10 ml. Larutan diencerkan sebanyak 5 kali pengenceran, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar (27°C) dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer Ultraviolet Visible pada panjang gelombang 760 nm.

b. Pembuatan kurva baku standar

Standar asam tanat sebanyak 0,0100 gram diambil dan ditambah reagen Folin-ciocalteu sebanyak 0,1 ml, kemudian divorteks dan didiamkan selama 5 menit. Larutan ditambah Na_2CO_3 20% sebanyak 2 ml, kemudian divorteks dan ditambah akuades steril hingga mencapai

volume 10 ml. Larutan diencerkan sesuai Tabel 3, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar (27°C). Larutan standar diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer Ultraviolet Visible pada panjang gelombang 760 nm.

Tabel 3. Pengenceran Larutan Baku Standar Asam Tanat

Conc.	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200	ppm
Larutan Stok	78,125	156,25	312,5	625	1250	2500	5000	µl
Akuades	4921,875	4843,75	4687,5	4375	3750	2500	0	µl
Volume	5	5	5	5	5	5	5	ml

9. Uji antibakteri berdasarkan luas zona hambat dengan metode sumuran (Andrews, 2001; Mpila dkk., 2012; Sitompul dan Nainggolan, 2011 dengan modifikasi)

Suspensi bakteri uji yang telah dibandingkan dengan standar 0,5 McFarland diambil 100 µl, kemudian diinokulasikan pada medium agar petri dengan metode *spread plate*. Sumuran pada medium dibuat dengan menggunakan perforator nomor 3 (diameter 6 mm) sebanyak 5 lubang sumuran. Dua sumuran masing-masing diisi dengan ekstrak etanol 65 µl dan 65 µl ekstrak akuades. Tiga sumuran lainnya masing-masing diisi dengan 65 µl DMSO, 65 µl etanol 96%, dan 65 µl akuades sebagai kontrol negatif serta ampisilin *disk* digunakan sebagai kontrol positif.

Medium agar petri kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam, dilakukan pengamatan ada tidaknya zona bening. Zona hambat yang terbentuk

kemudian diamati, diukur, dan didokumentasi. Menurut Volk dan Wheeler (1993), luas zona hambat dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Luas zona hambat} = 3,14 \times \left[\left(\frac{d_2}{2} \right)^2 - \left(\frac{d_1}{2} \right)^2 \right]$$

Keterangan:

d1 : diameter sumuran (0,6 cm)

d2 : rata-rata diameter zona hambat (cm)

10. Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (Sitompul dan Nainggolan, 2011 dengan modifikasi; Andrews, 2001)

Pengukuran Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan metode dilusi agar dengan variasi konsentrasi 100, 75, 50, 25, dan 12,5 mg/ml. Setiap konsentrasi ekstrak sebanyak 1 ml ditambahkan ke dalam 1 ml inokulum kemudian dilarutkan menggunakan vortex. Kontrol positif yang digunakan yaitu antibiotik ampicilin dan kontrol negatif yang digunakan yaitu inokulum tanpa penambahan ekstrak.

Setiap tabung reaksi yang telah ditambahkan konsentrasi ekstrak, kontrol positif dan kontrol negatif kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-20 jam. Pasca inkubasi, inokulum dari setiap tabung diambil sebanyak 100 µl dan diinokulasikan pada medium nutrisi agar dengan metode *spread plate*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pasca inkubasi, dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri pada masing-masing konsentrasi ekstrak. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan oleh tidak adanya pertumbuhan bakteri pada setiap konsentrasi ekstrak pasca diinokulasikan pada medium agar petri dengan metode

spread plate. Konsentrasi ekstrak terkecil yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

11. Analisis data (Yulianti, 2014)

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANAVA dengan tingkat kepercayaan 95%. Apabila hasil ANAVA menunjukkan hasil yang berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui letak beda nyata antarperlakuan. Analisis ANAVA dan DMRT ini dilakukan dengan menggunakan program SPSS versi 18.0.